

THESIS

MARBURG

1965

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg an der Lahn
(Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert)

Zur antigenen Stammspezifität des Herpes-simplex-Virus
in der Komplementbindungsreaktion

Inauguraldissertation
zur

Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von
Ellen Niemeyer
aus Gadderbaum, Kr. Bielefeld

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg an der Lahn
(Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert)

Zur antigenen Stammspezifität des Herpes-simplex-Virus
in der Komplementbindungsreaktion

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

Ellen Niemeyer

aus Gadderbaum, Kr. Bielefeld

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität
Marburg

am. 29. Juli. 1965....

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. med. H. Hensel

Referent: Doz. Dr. med. D. Falke

Correferent: Prof. Dr. med. R. Siegert

Inhaltsübersicht

	Seite
I. <u>Einleitung</u>	1
II. <u>Material und Methoden</u>	
1. Virusstämme	5
2. Zellkulturen	
a) Kaninchennieren-Zellen	5
b) HeLa-Zellen	6
c) FL-Zellen	7
d) Hühnerfibroblasten-Zellen	7
3. Immunisierung der Versuchstiere, Gewinnung und Aufbewahrung der Seren	7
4. Komplementbindungsantigen	9
5. Komplementbindungsreaktion	10
6. Zentrifugieren im Dichtegradienten	11
III. <u>Ergebnisse</u>	
1. Auswertung der Antigene	11
2. Auswertung der Immunsere von Meerschwein- chen und Hamstern	13
3. Dichtegradienten-Versuch	14
4. Kreuzreaktionen zwischen den Stämmen THEA und HAASE	16
5. Kreuz-Komplementbindungsreaktionen der Antigene THEA und HAASE mit Meerschwein- chen-Hyperimmunsere von 8 Herpes-simplex- Stämmen	19
6. Kreuz-Komplementbindungsreaktionen der Antigene LOR und OS mit den Meerschwein- chen-Hyperimmunsere THEA, HAASE, LOR und OS	21
7. Untersuchung von Patientensere mit den Antigenen THEA und HAASE	23
8. Untersuchung von Seren von Herpes- Rezidiven	23
IV. <u>Besprechung</u>	24
V. <u>Zusammenfassung</u>	27
VI. <u>Literaturverzeichnis</u>	28



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153508_0061

I. Einleitung

Der praktischen Medizin war es lange Zeit nicht möglich, die unter dem Begriff des "Herpes" auftretenden Hauterscheinungen klinisch oder ätiologisch zu trennen. Man zählte dazu den Herpes simplex und den Herpes zoster sowie andere Erkrankungen, die mit bläschenförmigen Veränderungen der Haut oder Schleimhaut einhergehen.

Erst GRÜTER (1920) hat 1912 - 1913 in Marburg festgestellt, daß in den Läsionen der Keratitis herpetica ein einheitliches infektiöses Agens enthalten ist: das Herpes-simplex-Virus. LÖWENSTEIN (1919) bestätigte diese Befunde dann auch für die Herpesläsionen der Lippenschleimhaut und der Gesichtshaut. Das ursächliche Agens ruft nicht nur krankhafte Veränderungen der Kornea, der Haut und der Schleimhäute, sondern unter besonderen Bedingungen auch an den inneren Organen (TUCKER und SCOFIELD, 1961) sowie dem Nervensystem (u.a. HAYMAKER, 1949; KRÜCKE, 1957) hervor. Das Virus breitet sich auf dem Blut- und/oder Nervengang im Organismus aus.

Nach BURNET (1960) sind mit dem Herpes-simplex-Virus (Herpesvirus hominis) nicht nur das B-Virus (Herpesvirus simiae), sondern auch das Pseudorabiesvirus (Herpesvirus suis) eng verwandt. Neuerdings wird auch das Cytomegalie-Virus auf Grund morphologischer Kriterien in die Herpes-Gruppe eingeordnet (WRIGHT und Mitarb., 1964). Auch die Erreger der Varizellen und des Zoster gehören morphologisch in diese Gruppe, wenn sie auch einige grundsätzliche biologische Differenzen aufweisen.

BLANK und RAKE (1955) teilen die klinischen Erscheinungen der Herpes-simplex-Infektionen nach serologischen Gesichtspunkten in 2 Gruppen ein, nämlich Krankheiten ohne Anwesenheit von Antikörpern (Primärinfektionen) und klinische Symptome in Gegenwart von Antikörpern (Rezidive oder Reinfektionen). Während die Primärinfektionen mannigfaltige Erscheinungsbilder mit wechselnder Beteiligung der inneren Organe verursachen, ist das klinische Bild des rekurrierenden Herpes im allgemeinen wesentlich leichter und einheitlicher. Es besteht aus gruppenweise angeordneten Bläscheneruptionen auf einem entzündlich geschwellenen Haut- oder Schleimhautareal. In seltenen Fällen nur findet sich auch eine rezidivierende Enzephalitis.

Bei den unterschiedlichen Krankheitserscheinungen, der verschiedenen Rezidivneigung und der Häufigkeit der subklinischen Infektionen ergibt sich die Frage, ob die Herpes-simplex-Stämme biologisch einheitlich sind. In diesem Zusammenhang muß besonders an antigene Differenzen gedacht werden.

Schon GRÜTER (1924) fielen bei seinen Übertragungsversuchen auf die Kaninchenkornea Unterschiede im Virulenzgrad einzelner Stämme auf. Ähnliche Beobachtungen wurden später auch von anderen Autoren mitgeteilt. Immunbiologische Unterschiede konnte GRÜTER (1920) allerdings nicht nachweisen, sodaß er das Herpes-simplex-Virus für einheitlich hielt.

BURNET und LUSH (1939) führten erstmals serologische Vergleiche zweier Stämme im Neutralisationstest auf der Chorioallantoismembran des Hühnerembryo durch, die ebenfalls in ihrem antigenen Verhalten übereinstimmten.

HAYWARD (1949, 1950) prüfte 4 frisch isolierte Herpes-simplex-Stämme im Neutralisationstest auf der Chorioallantoismembran und in der Komplementbindungsreaktion. Weder bei Verwendung von Meerschweinchen-Immunseren, noch von menschlichen Rekonvaleszentenseren ließen sich antigene Differenzen nachweisen. Zu einem entsprechenden Ergebnis kamen auch KILBOURNE und HORSFALL (1951) bei drei Stämmen im Neutralisationstest an jungen Mäusen.

Während die vorgenannten Autoren Stämme von verschiedenen Patienten verglichen, haben GARABEDIAN und SYVERTON (1955) erstmals mehrere Stämme, die von wiederholten Herpesausbrüchen e i n e s Patienten isoliert worden waren, im Kreuz-Neutralisationstest an Mäusen gegenübergestellt. Stammspezifische Unterschiede ließen sich auch hier nicht erkennen.

Auch GROSS und Mitarb. (1956) konnten bei 2 Virusstämmen e i n e s Patienten im Kreuz-Neutralisationstest auf der Chorioallantoismembran keine serologischen Unterschiede feststellen.

Auf antigene Differenzen machten erstmals SLAVIN und GAVETT (1946) bei 3 in Mäusen (intracerebral) fortgeführten Herpes-simplex-Stämmen (HF, LH, FE) aufmerksam. Sie fanden, daß ein Kaninchen-Immunserum gegen den Stamm LH im Neutralisationstest (Maus) den homologen, nicht aber die heterologen Stämme zu neutralisieren vermochte. Gleichsinnig verhielt sich auch das menschliche Rekonvaleszenten Serum. Umgekehrt neutralisierte das gegen den Stamm FE gerichtete Antiserum den homologen Stamm und in entsprechendem Maße auch den HF-Stamm. Der LH-Stamm unterschied sich jedoch deutlich von beiden.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen FLORMAN und TRADER (1947). Von 4 Stämmen differierte 1 Stamm im Neutralisationstest an Mäusen und auf der Chorioallantoismembran von den übrigen. Sein Antiserum neutralisierte die 3 heterologen Stämme nur teilweise.

WOMACK und RANDALL (1953) prüften das Serum einer Patientin mit primärer Vulvo-Vaginitis im Neutralisationstest an Mäusen gegen 2 verschiedene Herpes-Stämme. Das Serum neutralisierte den einen Stamm deutlich stärker als den anderen.

Bei einer weiteren Prüfung von 11 Stämmen in der Kreuz-Komplementbindungsreaktion stellten WOMACK und HUNT (1954) fest, daß neben Übereinstimmungen auch geringfügige Unterschiede der Stämme bestanden. Auch JAWETZ und Mitarb. (1955) fanden antigene Stammunterschiede.

OKUMOTO und Mitarb. (1955) führten mit 2 Stämmen Immunisierungsversuche an der Kaninchenkornea durch. Sie beobachteten, daß die Hornhaut nur bei Reinfektion mit dem gleichen Stamm immun war. Bei Vergleichen im Kreuz-Neutralisationstest an Mäusen wurde das homologe Virus besser neutralisiert als das heterologe.

CHU und WARREN (1960) benutzten als erste Zellkulturen (Kaninchennieren-Zellen) für Neutralisationsteste. Sie prüften 4 Stämme mit den homologen Meerschweinchen-Immunseren. Bei Kreuz-Reaktionen neutralisierte ein Antiserum die heterologen Stämme nicht. Bei den anderen drei Stämmen konnten allerdings keine Antigendifferenzen beobachtet werden.

Die umfangreichsten Untersuchungen gehen auf SCHNEWEIS (1962) zurück, der 30 Herpes-Stämme im Kultur-Neutralisationstest und in der Komplementbindungsreaktion verglich. Die Neutralisationsteste wurden auf dreierlei Weise ausgeführt: 1. Abfallende Serumverdünnungen gegen eine konstante Virusdosis von ca. 10^2 plaque-bildenden Einheiten (PBE). 2. Abfallende Serumverdünnungen gegen eine konstante Virusdosis von ca. 10^5 PBE. 3. Konstante Serumverdünnungen gegen eine konstante Virusdosis von ca. 10^5 PBE, um den zeitlichen Ablauf der Neutralisationsreaktion zu verfolgen. Außerdem wurden die Inkubations- und Adsorptionszeiten variiert. Die Komplementbindungsreaktion erfolgte nach einer Mikromethode auf Plexiglasplatten. Die Immunseren stammten von Kaninchen.

Im Neutralisationstest konnte SCHNEWEIS 2 "Typen" unterscheiden, die sich mit allen 3 Methoden nachweisen ließen. Die Differenzen waren allerdings gering. Als Prototyp I bezeichnete er den Stamm THEA, als Prototyp II den Stamm HAASE. Das Anti-THEA-Serum neutralisierte den homologen Stamm viel besser als den heterologen. Umgekehrt neutralisierte aber das Anti-HAASE-Serum sowohl den homologen als auch den heterologen Stamm in gleicher Stärke. Die Unterschiede ließen sich also nur mit Kaninchen-Immunseren gegen den Stamm THEA nachweisen, nicht aber mit Seren gegen Stamm HAASE, d.h. die Unterschiede waren nicht reziprok. Die Komplementbindungsreaktion lieferte weniger deutliche Unterschiede.

Auch ROIZMAN und ROANE (1963) haben bei Plaque-Varianten serologische Differenzen festgestellt.

Seit den Arbeiten von GRAY und Mitarb. (1958) sowie SCOTT und Mitarb. (1959), die beim Herpes-simplex-Virus verschiedene Formen des cytopathischen Effekts (CPE) in Kulturzellen beobachtet hatten, suchte man Beziehungen zwischen der Art des CPE und der Antigenität der Stämme herzustellen.

SCHNEWEIS (1962) glaubt, den 2 "Typen" jeweils bestimmte biologische Eigenschaften zuordnen zu können, wofür folgende Beobachtungen sprechen: Die Stämme vom "Typ" I zeigten mit einer einzigen Ausnahme (HFEM-Stamm) in den ersten Passagen nach der Isolierung "proliferative" Zellveränderungen (nach SCOTT, 1959). Stämme des "Typ" II erzeugten frühzeitiger auftretende, aber sich bald aufspaltende Herde. Auf der Chorioallantoismembran rief der "Typ" II größere Läsionen als der "Typ" I hervor.

Die in verschiedenen Laboratorien erhobenen Befunde über Stamm- und Typendifferenzen des Herpes-simplex-Virus lassen sich jedoch nicht vergleichen, da mit sehr unterschiedlichen Methoden (Variation von Bindungsdauer, Temperatur, Virusdosis sowie Immunseren verschiedener Tierarten) und mit auf verschiedene Weise adaptierten Stämmen gearbeitet wurde. Auch ist nicht sicher, inwieweit die Identität mancher Stämme im Verlauf zahlreicher Passagen gewahrt wurde.

In der vorliegenden Arbeit sollen deshalb 8 von SCHIEFERSTEIN (1963) unter gleichen Bedingungen isolierte und nur auf Kaninchennieren-Zellen adaptierte Herpes-simplex-Stämme mit den

von SCHNEWEIS isolierten Stämmen THEA und HAASE hinsichtlich ihres antigenen Verhaltens in der Komplementbindungsreaktion verglichen werden.

Außerdem interessierte die Frage, ob sich auch in Patienten-seren "typenspezifische" Unterschiede feststellen lassen. In diesem Fall würden für die Serodagnostik mehrere Antigene benötigt, um alle Antikörpertypen zu erfassen. Besondere Aufmerksamkeit schenkten wir Seren nach Primärinfektion in der Erwartung, daß sie in Analogie zu den Verhältnissen bei der Influenza am spezifischsten reagieren. Zum Vergleich wurden Rezidivseren herangezogen.

II. Material und Methoden

1. Virusstämme

- a) HAASE: isoliert von Herpes-simplex-Bläschen am Oberarm⁺)
- b) THEA: isoliert von Keratitis dendritica⁺)
- c) BLU: isoliert von primärem Herpes simplex an der Wange
- d) GER: isoliert von Herpes labialis
- e) KIA: isoliert von Herpes simplex am Ohr
- f) KO: isoliert von Herpes-simplex-Bläschen perioral
- g) OS: isoliert von Herpes labialis
- h) SCH: isoliert von Herpes simplex am Kinn
- i) REI: isoliert von Herpes labialis
- j) LOR: isoliert von Herpes labialis

Bei Versuchsbeginn befanden sich die Herpes-simplex-Stämme c-h in der 9.-10., die Stämme i-j in der 3.-4. Kaninchen-nieren-Passage. Über die Vorgeschichte der Stämme THEA und HAASE im Laboratorium lagen keine Angaben vor. Die Agentien c-j waren von SCHIEFERSTEIN (1963) isoliert und im Neutralisationstest mit einem Kaninchen-Hyperimmunserum gegen den Herpes-simplex-Stamm HFEM identifiziert worden.

2. Zellkulturen

a) Kaninchen-nieren-Zellen

Die Nieren von 1-3 Wochen alten Kaninchen wurden steril entnommen, in einem Zentrifugenglas mit der Schere zer-kleinert und anschließend zweimal mit LAHN-Lösung

⁺)Für die Überlassung der Stämme "THEA" und "HAASE" sei Herrn Doz. Dr. K.-E. SCHNEWEIS, Hygiene-Institut der Universität Göttingen, herzlich gedankt.

(HANKS-Lösung mit 0,5% Lactalbuminhydrolysat) gewaschen, um Zelltrümmer und Blutreste zu entfernen. Das Nierengewebe wurde dann mit etwa 50ml einer auf 37°C erwärmten Trypsinlösung in einem Spezialgefäß enzymatisch in kleine Zellaggregate zerlegt und dabei mit einem Magnetrührer umgewirbelt. Nach 20-30 Minuten entnahmen wir den durch Einzelzellen und kleinere Zellaggregate getrübbten Überstand. Er wurde vorsichtig durch eine vierfache Gazelage in einen eisgekühlten Erlenmeyerkolben abgegossen. Die größeren Gewebsstücke wurden erneut trypsiniert. Nach vier- bis fünfmaligem Wiederholen waren die Gewebstückchen fast vollständig in Einzelzellen aufgelöst. Es blieb nur noch bindegewebiges Stroma zurück.

Die eisgekühlte, durch Zellen getrübbte Trypsinlösung wurde anschließend 5 Min. lang bei 1000 UpM zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellsediment mit LAHN-Lösung gewaschen und in Wachstumsmedium (1ml Sediment/1000ml) aufgenommen. Es bestand aus 90% LAHN-Lösung, 10% Kälberserum und den üblichen Zusätzen an Antibiotica (Penicillin, Streptomycin, Moronal). Der pH-Wert war mit Natriumbicarbonatlösung auf 7,2 - 7,4 eingestellt worden.

Je 70ml Zellsuspension wurden in eine Roux-Flasche (Fa. Schott & Gen., Mainz) gegeben und bei 37°C im Brutschrank inkubiert, wobei sich innerhalb von 3 - 4 Tagen ein einschichtiger Zellrasen ausbildete, der vorwiegend aus Epithelzellen bestand und mit Fibroblasten durchsetzt war. Vor dem Beimpfen der Zellkulturen wurde das Wachstumsmedium durch Erhaltungsmedium ersetzt, das sich aus 98% EARLEsche Lösung und 2% Kälberserum mit Antibioticzusatz (pH-Wert 7,2 - 7,4,) zusammensetzte.

b) HeLa-Zellen

Für die Versuche wurde ein kontinuierlich fortzuchtbarer HeLa-Stamm⁺⁾ verwendet, der sich bei Versuchsbeginn in der 188. Passage befand.

Zuerst wurde das alte Medium der vollständig ausgewachsenen Zellkulturen abgesaugt, und der Zellrasen mit

⁺⁾ Frau Doz. Dr. LENNARTZ, Laboratorium zur Bekämpfung der spinalen Kinderlähmung, Hamburg, sei für die Überlassung des HeLa-Stammes gedankt.

Versenlösung abgespült, um Magnesium- und Calcium-Ionen zu entfernen. Hiernach kam neue Versenlösung zur Zellkultur, die 10 - 15 Min. bei 37°C im Brutschrank blieb. Dann wurde die Kulturflasche gut geschüttelt, bis sich die Zellen vom Glas gelöst hatten, und die Zellsuspension in ein steriles Zentrifugenglas eingefüllt. Die Zellen wurden ca. 1 Min. bei 2000 UpM zentrifugiert und nach Entfernung des Überstandes nochmals mit LAHN-Lösung gewaschen.

Das Zellsediment nahmen wir in dem dreifachen Volumen des Mediums auf und verteilten es auf Kulturflaschen, die bei 37°C bebrütet wurden. Das Anzuchtmedium setzte sich folgendermaßen zusammen: 70% LAHN-Lösung (autoklaviert), 10% Kälberserum (aktiv), 20% TCM (nach Morgan, Morton u. Parker 199) und der üblichen Menge Antibiotica, pH-Wert 7,2 - 7,4.

Nachdem ein vollständiger Zellrasen ausgewachsen war, wurde das alte Medium vor dem Beimpfen durch Erhaltungsmedium (Zusammensetzung wie bei Kaninchennieren-Zellen) ersetzt.

c) FL-Zellen

Für die Versuche wurde ein Stamm FL-Zellen (FOGH und LUND 1957), der an Kälberserum adaptiert war, benutzt und in der gleichen Weise wie die HeLa-Zellen gezüchtet.

d) Hühnerfibroblasten-Zellen

Hühnerembryonen im Alter von 10 - 12 Tagen wurden unter sterilen Bedingungen aus der Schale entnommen, nach Entfernen von Kopf und Extremitäten mit der Schere zerkleinert und dann in etwa 50ml Trypsinlösung 1 - 2 Std. bei 37°C trypsiniert. Nachdem die durch die Zellen getrübe Lösung 5 Min. lang kräftig geschüttelt und anschließend 5 Min. bei 1000 UpM zentrifugiert worden war, wurde das Zellsediment mit LAHN-Lösung gewaschen. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie bei den Kaninchennieren-Zellen.

3. Immunisierung der Versuchstiere, Gewinnung und Aufbewahrung der Seren.

Die Antigene für die Immunisierung waren durch Virus-

züchtung in Kaninchennieren-Zellen gewonnen worden.

Je 3 Roux-Flaschen mit Kaninchennieren-Zellen wurden mit $1-5 \times 10^4$ PBE des von jedem Stamm bei -80°C eingefrorenen Virusmaterial beimpft und im Brutschrank bei $+37^\circ\text{C}$ inkubiert. Nach 48 Std. war ein vollständiger cytopathischer Effekt (CPE) eingetreten, sodaß das Virus geerntet werden konnte.

Die Aufarbeitung der Antigene geschah in folgender Weise: Die Kulturflaschen kamen für 1-2 Std. in den Kühlschrank, damit sich der Zellrasen leichter von der Glaswand löste. Nach kräftigem Schütteln wurden die Kulturflüssigkeiten mit den abgelösten Zellen in Zentrifugengläser abgegossen und 15 Min. bei 4500 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und kühlgestellt, das Sediment in 2ml des Überstandes aufgenommen und 10 Min. im Glaskugelhomogenisator (Fa. Bühler, Tübingen; Schüttelfrequenz: 3200/Min., Durchmesser der Glasperlen: 0,5mm) homogenisiert. Nachdem das Homogenisat 10 Min. bei 4500 UpM zentrifugiert worden war, konnten die Überstände zusammengegeben werden. Das Virus wurde in der Ultrazentrifuge (Fa. Beckmann, Spinco L50, Rotor 21) 150 Min. bei 19000 UpM (ca. 35000 mittlere g) ausgeschleudert.

Nach Entfernen des Überstandes wurde das Sediment in $1/30$ des Ausgangsvolumens in Natriumphosphatpuffer (PBS) mit einem pH-Wert von 7,2-7,4 aufgenommen. Nachdem die Virus-suspension über Nacht im Kühlschrank bei $+4^\circ\text{C}$ gestanden hatte, wurde sie durch mehrmaliges Einsaugen in eine Spritze homogenisiert und zur Entfernung von Zelltrümmern 15 Min. bei 4500 UpM zentrifugiert. Der Überstand stellte das Antigen für die Immunisierung dar.

Zur Bestimmung der Infektiosität wurden von jeder Verdünnungsstufe (Faktor 10) jeweils 2 Röhrchen beimpft, deren Plaquezahl 48 Std. später unter dem Mikroskop (35-fache Vergrößerung) ausgezählt und daraus der Mittelwert berechnet wurde.

Die Virustiter (in plaquebildenden Einheiten: PBE) einiger für die Immunisierung verwendeten Antigenpräparationen betrugen:

1. HAASE: 1×10^5 PBE/0,2ml
2. THEA: 6×10^6 PBE/0,2ml

3. BLU: 5×10^6 PBE/o,2ml

4. SCH: 1×10^7 PBE/o,2ml

Zur Gewinnung der Hyperimmunseren wurden pro Virusstamm je 2 Meerschweinchen (Gewicht: 450 - 510g) und 2 Hamster (Gewicht: 70 - 90g) verwendet.

a) Meerschweinchen

Die Erstinjektion erfolgte mit 1ml der konzentrierten, aktiven Virussuspension intramuskulär in eine der hinteren Extremitäten. Ein Tier (Stamm THEA) starb nach 11 Tagen, 2 Tiere zeigten nach 9 bzw. 11 Tagen an beiden hinteren Extremitäten Lähmungen, die jedoch nach weiteren 5 Tagen zurückgegangen waren. Die 2. Injektion erfolgte 14 Tage später mit der gleichen Dosis, Die 3. Injektion wurde 4 Wochen nach der 2. vorgenommen.

12 Tage nach der letzten Injektion wurden die Seren durch Herzpunktion gewonnen, 30 Min. bei $+56^{\circ}\text{C}$ inaktiviert und bei -20°C aufbewahrt.

b) Hamster

Die Erstinjektion erfolgte mit 0,5ml der konzentrierten, aktiven Virussuspension intramuskulär in eine hintere Extremität. 8 Tiere starben 5 - 10 Tage nach der Infektion, darunter 2 Tiere vom Stamm THEA. Fast alle Tiere zeigten 8 - 10 Tage nach der Infektion Lähmungs- und Krankheitserscheinungen, die aber in den folgenden Tagen wieder verschwanden. Bei einem Hamster (Stamm KLA) trat eine Kerato-Konjunktivitis am rechten Auge auf; bei diesem Tier blieb die Lähmung der hinteren Extremitäten bestehen. Als Ersatz für die eingegangenen Hamster wurde je ein neues Tier mit 1/100 der früheren Virusdosis infiziert. Die 2. Injektion erfolgte 6 Wochen nach der ersten, die 3. Injektion 3 Wochen nach der zweiten.

17 Tage nach der letzten Injektion wurden die Seren durch Herzpunktion gewonnen, 1:2 mit Veronalpuffer verdünnt, 30 Min. bei $+64^{\circ}\text{C}$ inaktiviert und bei -20°C eingefroren.

4. Komplementbindungsantigen

Die Virusstämme wurden zunächst in HeLa- oder FL-Zellen

gezüchtet und in der gleichen Weise - wie bereits beschrieben - aufgearbeitet. Nach dem Ultrazentrifugieren war das Sediment in 5ml PBS aufgenommen worden. Ebenso wurde die Viruszüchtung in Hühnerfibroblasten-Zellen durchgeführt.

Auch Kaninchennieren-Zellen wurden zur Antigengewinnung herangezogen. Das Sediment war nach der durch Ultrazentrifugieren erfolgten Anreicherung in 1,5ml PBS + 1% Rinderalbumin aufgenommen worden. Außerdem wurden 4 Stämme (THEA, HAASE, LOR und OS) auf je 17 Roux-Flaschen verimpft. Das Homogenisat wurde 15 Min. bei 2000 UpM zentrifugiert. Die Virussuspension wurde über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt, danach gut durchpipettiert, anschließend mehrmals durch eine Rekordspritze mit 16er Kanüle gespritzt und nochmals bei 2000 UpM zentrifugiert. Der Überstand diente als Antigen.

Die Antigene THEA und HAASE (DF 166 und DF 165) wurden so verdünnt, daß sie jeweils 4 Antigeneinheiten gegenüber dem Meerschweinchen-Hyperimmunserum LENNETTE (Verd. 1:16) enthielten.

5. Komplementbindungsreaktion

Die Komplementbindung führten wir nach TAKATSY in der Modifikation von SEVER (1962) durch. Wir benutzten Plexiglasplatten, in denen sich 12 Reihen mit je 8 Vertiefungen befanden. In jede der Vertiefung wurde mit einer speziellen Tropfpipette je 1 Tropfen (=0,025 ml) Puffer vorgelegt. Die Verdünnungsreihen stellten wir mit Hilfe von geeichten Kugelspiralen ("loops") her, die ebenfalls 0,025 ml Flüssigkeit faßten. Anschließend wurde je 1 Tropfen Serum bzw. Antigen und Komplement (2 Einheiten) hinzugefügt. Die Platten wurden zur Bindung über Nacht in einer feuchten Kammer im Kühlschrank aufbewahrt. Am nächsten Morgen kamen in jede Vertiefung 2 Tropfen hämolytisches System. Die Vertiefungen in den Platten wurden schließlich durch eine transparente Klebefolie verschlossen und 2 Std. bei +37°C inkubiert.

Danach erfolgte die Ablesung. Als Titergrenze galten nur 4+ (=vollständige Hämolysehemmung) und 3+ (=ca. 75%-ige Hämolysehemmung) Reaktionen. Eine Kontrolle des Ergebnisses erfolgte nach 8 Std.

6. Zentrifugieren im Dichtegradienten

Die Trennung einer Mischung von Makromolekülen verschiedener Dichte, wie sie bei Virussuspensionen vorliegt, ist durch eine "Equilibrium-Dichte-Gradienten-Zentrifugation" (MESSELSOHN und Mitarb., 1957) möglich, wobei der Gradient während des Zentrifugierens entsteht. Dabei reichern sich die Makromoleküle (Viruspartikel) entsprechend ihrer Dichte in den korrespondierenden Schichten des Gradienten an.

1,4 ml CsCl (Dichte 1,820), 1,4 ml Antigen (Konzentrat des Herpes-simplex-Stammes LENNETTE nach Ultrazentrifugieren) sowie 2,2 ml PBS + 1 % Rinderalbumin wurden gemischt, in Röhrchen gefüllt (Ausgangsdichte 1,229) und 24 Std. bei 34000 UpM im Schwenkbecherrotor der Spinco-Ultrazentrifuge (Fa. Beckmann, Rotor SW 39) zentrifugiert. Nach dem Ultrazentrifugenlauf sind die Röhrchen mit 2er Kanülen von unten angestochen und 20 Fraktionen gewonnen worden, die jeweils 5 Tropfen enthielten. Die Dichte wurde anschließend durch Wägen mittels geeichter Hb-Mikropipetten bestimmt.

Vor der Austestung in der Komplementbindungsreaktion wurden die Fraktionen 48 Std. lang gegen PBS dialysiert (3 mal Wechsel der Dialyseflüssigkeit), da sich CsCl in hoher Konzentration als stark antikomplementär erwiesen hatte. Das Volumen der Antigene kontrollierten wir vor und nach der Dialyse.

III. Ergebnisse

1. Auswertung der Antigene

Für Typenbestimmungen sind hochwertige Virusantigene und Immunseren ohne zellspezifische Antikörper erforderlich. Die Antigene für die Komplementbindungsreaktion mußten deshalb in anderen Zellen gewonnen werden als das zur Immunisierung verwendete Virusmaterial.

a) Antigene aus HeLa-, FL- und Hühnerfibroblasten-Zellen

Die Präparationen der Stämme THEA, BLU, GER und LOR aus HeLa-Zellen erwiesen sich als stark antikomplementär bis zu einer Verdünnung von 1:8. Bei höherer Verdünnung war keine ausreichende antigene Wirkung mehr vorhanden. Auch nach nochmaligem Zentrifugieren (20 Min. bei 8000 UpM, Kühlzentrifuge der Fa. Christ) konnte die antikomple-

mentäre Wirkung nicht verringert werden, sodaß die Antigene unbrauchbar waren.

Die Antigene LOR, KLA, OS als auch ein Kontrollantigen aus normalen FL-Zellen hatten ebenfalls einen hohen Komplementverbrauch. Das Kontrollantigen reagierte mit 3 Meerschweinchen-Hyperimmunseren unspezifisch. Deshalb konnten auch diese Präparationen nicht verwendet werden.

Die auf Hühnerfibroblasten-Zellen verimpften Stämme vermehrten sich sehr schlecht. Nach 6 Tagen Inkubation war der cytopathische Effekt noch nicht vollständig. Trotzdem wurde das Material aufgearbeitet. Der Komplementverbrauch der Antigene und des Kontrollantigens aus Hühnerfibroblasten-Zellen war zwar wesentlich geringer als bei den Präparationen aus HeLa- und FL-Zellen jedoch war ihr Antigengehalt zu gering, sodaß auch sie verworfen werden mußten.

Antigene aus Kaninchennieren-Zellen

Da es nicht gelungen war, aus den genannten Zellarten brauchbare Antigen zu gewinnen, entschlossen wir uns, Präparate aus Kaninchennieren-Zellen herzustellen, in denen sich das Herpes-simplex-Virus erfahrungsgemäß gut vermehrt.

Die Antigene aus Kaninchennieren-Zellen reagierten nicht mit Serum von Kaninchen, die mit normalen Kaninchennieren-Zellen immunisiert worden waren, sodaß sie zur Typenbestimmung der Stämme herangezogen werden konnten.

Der Komplementverbrauch dieser Antigene war gering. Die Antigentiter, die an einem Meerschweinchen-Hyperimmunserum gegen den Stamm LENNETTE (Verd. 1 : 16) gemessen wurden, lagen im Durchschnitt bei 1 : 8 oder darunter.

Wir haben in Tabelle 1 die Antigen- und Infektionstiter, die sofort nach der Herstellung der Antigene bestimmt wurden, gegenübergestellt. Die Infektions- und Komplementbindungsaktivität sind nicht voneinander abhängig, weil - wie bekannt - ein sogenanntes lösliches Antigen auftritt, und nach Zerstörung der Infektiosität

(durch 30 Min. Erwärmung auf 56°C) die Komplementbindungs-
antigenität unverändert bleibt.

Tabelle 1 Infektions- und Komplementbindungstiter der
Antigene aus infizierten Kaninchennieren-Zellen

Antigene	Infektionstiter PBE/o,2ml	Antigentiter gegen Immunserum LENNETTE (Verd. 1 : 16)
HAASE	2 x 10 ⁵	1:4
THEA	1 x 10 ⁷	1:4
BLU	1 x 10 ⁷	1:4
GER	1,6 x 10 ⁸	1:8
KLA	5 x 10 ⁵	1:4
KO	5 x 10 ⁵	1:8
LOR	8 x 10 ⁶	1:8
OS	4 x 10 ⁷	1:4
REI	5 x 10 ⁷	1:8
SCH	3,2 x 10 ⁷	1:8

Um wirksame Antigene zu erhalten, wurden die Stämme
THEA, HAASE, LOR und OS noch stärker angereichert
(s. Material und Methoden, S. 10). Dadurch konnte zwar
ein höherer Antigentiter erzielt werden, jedoch reagier-
ten die Antigene in den Verdünnungen 1:2 und 1:4 etwas
antikomplementär. Durch Erhöhung der Komplementkonzen-
tration konnte die antikomplementäre Wirkung in der
Verdünnung 1:4 aufgehoben werden. Die spezifischen
Titer lagen bei 1:32 - 1:64.

Die Antigene DF 165 (=Antigen HAASE) und DF 166
(=Antigen THEA) waren frei von antikomplementären
Substanzen.

2. Auswertung der Immunseren von Meerschweinchen und Hamstern

Für die Tests wurden nur Meerschweinchen- und Hamster-
seren ohne antikomplementäre Wirkung herangezogen. Mit
einem Kontrollantigen aus normalen Kaninchennieren-Zellen
(Verd. 1:4) ergaben sich keine Reaktionen.

Ihr Antikörpergehalt wurde aus Vergleichsgründen im
Reihenverdünnungstest mit den Antigenen DF 165 (Verd.
1:2) und DF 166 (Verd. 1:4) geprüft.

Die Immunseren der Hamster besaßen Titer von 1:8 oder
darunter. Normalserum-Kontrollen gegen THEA- und HAASE-
Antigen waren negativ.

Die Antikörpertiter der Meerschweinchen-Hyperimmunseren gegenüber den gleichen Antigenen sind in Tabelle 2 aufgezeichnet. Es ist ersichtlich, daß die Seren - wie erwartet - einen unterschiedlichen Antikörpergehalt aufwiesen. Mit Kontrollantigenen aus nicht infizierten Kaninchennieren-Zellen waren keine Antikörper zu erfassen.

Tabelle 2 Auswertung von 10 Meerschweinchen-Hyperimmunseren mit den Antigenen HAASE und THEA

Meerschweinchen-Hyperimmunserum	Titer gegen Antigen	
	HAASE (DF 165, Verd. 1:2)	THEA (DF 166, Verd. 1:4)
HAASE	1:256	1:256
THEA	1: 32	1:128
BLU	1: 32	1:128
KLA	1: 32	1:128
KO	1: 32	1: 64
OS	1: 64	1:128
LOR	1:128	1:128
GER	1: 32	1: 32
REI	1: 8	1: 16
SCH	1: 16	1: 32
Kontrollserum	1: 2	1: 2

3. Dichtegradienten-Versuch

Bei der Auswertung der Antigene war immer wieder eine starke Eigenhemmung aufgefallen. Um zu bestimmen, welche Dichte die antikomplementären Substanzen haben und ob sie mit den Viruspartikeln in Zusammenhang stehen, wurde das Antigenmaterial durch Zentrifugieren im Dichtegradienten fraktioniert.

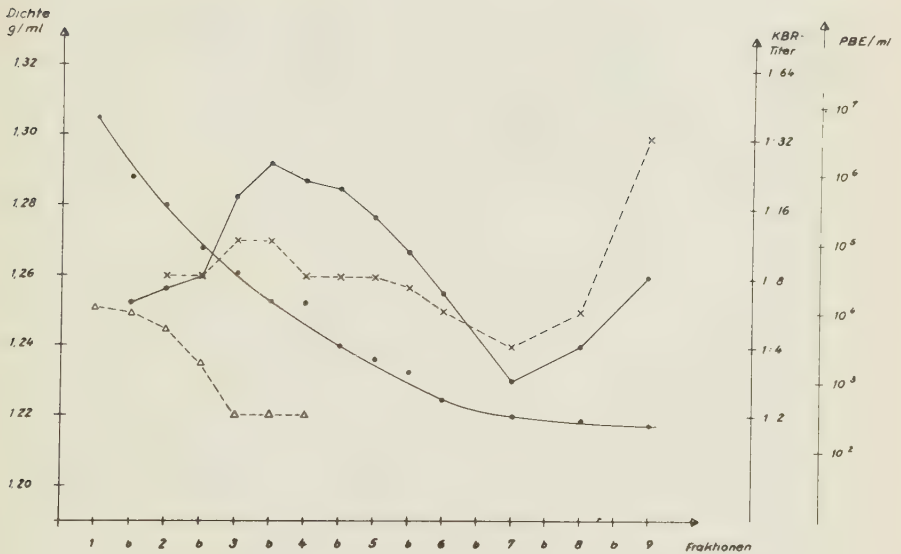
Zunächst waren die Dichte jeder Fraktion bestimmt und die Infektiosität ermittelt worden. Die einzelnen Fraktionen wurden dann auf ihr antikomplementäres Verhalten und ihre Antigenität geprüft.

Aus Abbildung 1 geht hervor, daß sich die antikomplementär wirkenden Stoffe in den Fraktionen 1 - 2b befanden, d.h. einer Dichte von etwa 1,305 - 1,280 angehörten. Das Maximum der Infektiosität wurde in den Fraktionen 3 - 3b - ebenso wie ein Teil der Komplementbindungs-

aktivität - angetroffen. Die stärkste komplementbindende Aktivität befand sich in der Fraktion 9.

Abbildung 1 Dichtegradiententrennung von biologischen Aktivitäten und antikomplementären Substanzen

Dichte (CsCl g/ml) —●—
 Infektiosität (PBE/o,2ml) —○—
 Komplementbindungstiter x—x—
 Eigenhemmung Δ---Δ



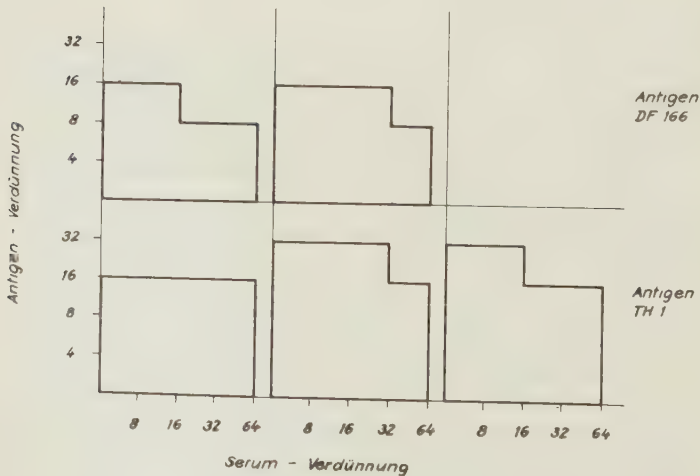
4. Kreuzreaktionen zwischen den Stämmen THEA und HAASE

In diesen Versuchen sollte zunächst gezeigt werden, wie die beiden Antigene THEA und HAASE mit den homologen Immunseren von Meerschweinchen reagieren, und inwieweit die Ergebnisse reproduzierbar sind.

2 THEA-Antigene (DF 166 und TH 1) wurden gegen das homologe Meerschweinchen-Hyperimmunserum geprüft. Mit beiden Antigenen erreichte der Antikörpertiter einen übereinstimmenden Wert von 1:64. In Abbildung 2 sind die Ergebnisse der in verschiedenen Ansätzen durchgeführten Untersuchungen aufgetragen.

Abbildung 2 Versuche über die Reproduzierbarkeit der Komplementbindungsreaktionen

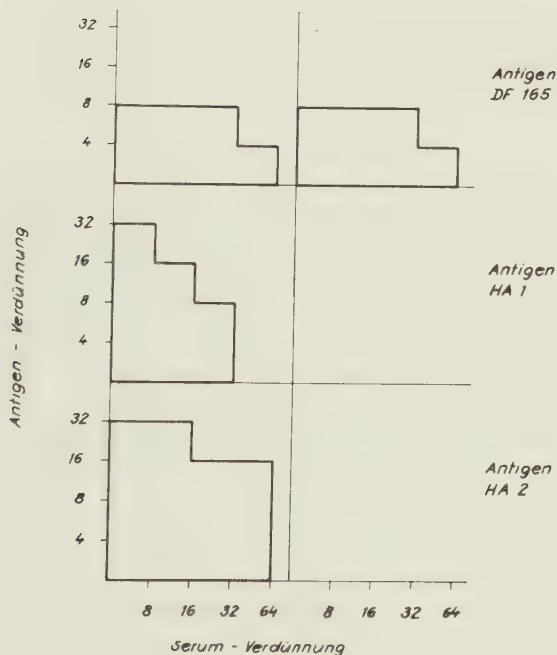
2 THEA-Antigene bei homologem Meerschweinchen-Hyperimmunserum
(Die umrandeten Felder geben die 4+- und 3+-Reaktionen an)



Vom Stamm HAASE wurden 3 Antigene (DF 165, HA 1 und HA 2) gegen das homologe Meerschweinchen-Hyperimmunserum geprüft. Die Antigene DF 165 und HA 2 ergaben in ihrer Gebrauchsverdünnung einen Antikörpertiter von 1:64, das Antigen HA 1 einen Titer von 1:32 (Abb. 3).

Abbildung 3 Versuche über die Reproduzierbarkeit der Komplementbindungsreaktionen

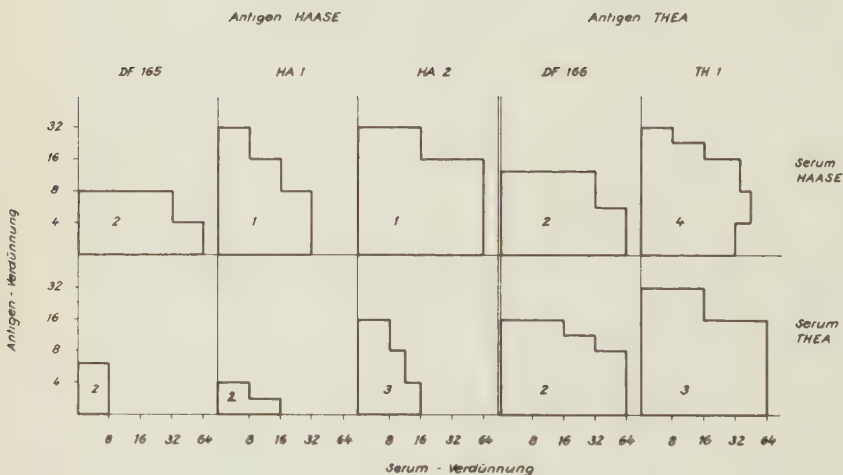
3 HAASE-Antigene bei homologem Meerschweinchen-Hyperimmunserum



Aus den in Abbildung 2 und 3 dargestellten Untersuchungen geht hervor, daß die Ergebnisse gut reproduzierbar sind. Die methodisch bedingten Schwankungen sind gering und liegen im Bereich der üblichen Fehlergrenze.

In Abbildung 4 sind die Resultate der Kreuzreaktionen zwischen den Stämmen THEA und HAASE aufgetragen worden.

Abbildung 4 Kreuz-Komplementbindungsreaktion zwischen den Antigenen HAASE und THEA und Meer-schweinchen-Hyperimmunseren HAASE und THEA



Während das Meerschweinchen-Hyperimmunserum THEA mit dem homologen Antigen Titer von 1:64 ergab, reagierte es mit dem Antigen HAASE nur in den Verdünnungen 1:8-1:16.

Das Meerschweinchen-Hyperimmunserum HAASE reagiert dagegen sowohl mit dem homologen als auch heterologen Stamm übereinstimmend noch in den Verdünnungen 1:32 und 1:64.

Da beide Antigene (THEA und HAASE) im homologen System etwa gleich stark reagiert hatten, dürfte für die schwache Reaktion des Antigens HAASE mit dem Immunserum THEA sicherlich eine Antigendifferenz verantwortlich zu machen sein.

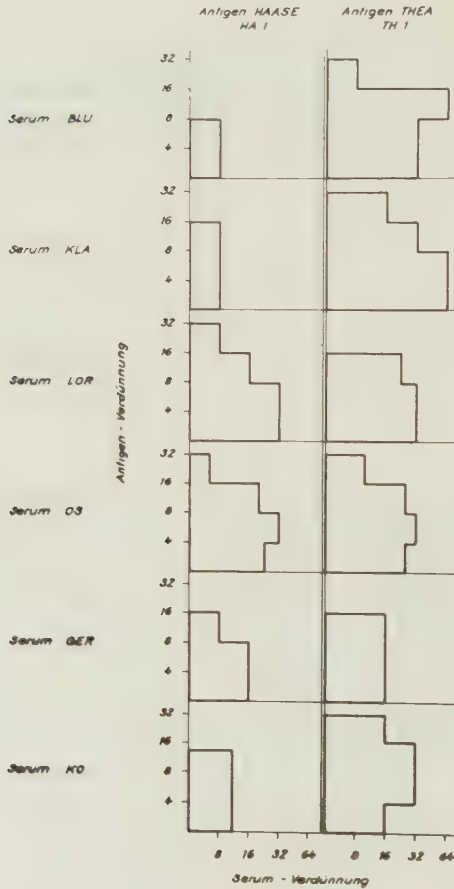
Aus den Untersuchungen wird der Unterschied im antigenen Reaktionsvermögen beider Stämme deutlich. Antigen THEA vermag mit beiden Immunseren gleichsinnig zu reagieren, während das Antigen HAASE die heterologen Antikörper erheblich schwächer bindet. Die Differenzen der beiden Herpes-simplex-Stämme THEA und HAASE sind demnach eindeutig.

5. Kreuz-Komplementbindungsreaktionen der Antigene THEA und HAASE mit Meerschweinchen-Hyperimmunseren von 8 Herpes-simplex-Stämmen

Nachdem im vorhergehenden Abschnitt Kreuzreaktionen zwischen den Stämmen THEA und HAASE beschrieben wurden, sollte nun das Verhalten der Antigene THEA und HAASE gegenüber den Seren von 8 Herpes-simplex-Stämmen (SCHIEFERSTEIN; 1963) geprüft werden.

Nach den Ergebnissen in Abbildung 5 können die Immunseren in drei Gruppen eingeteilt werden: 1. Seren (BLU, KLA), die wie Serum THEA reagieren. 2. Seren (LOR, GER, OS), die sich wie Serum HAASE verhalten. 3. Seren (KO), die ein intermediäres Verhalten zeigen und sich in keine der beiden Gruppen einordnen lassen. Die Seren gegen die Stämme REI und SCH zeigten mit keinem der beiden Antigene nennenswerte Titer.

Abbildung 5 Komplementbindungsreaktionen verschiedener
Meerschweinchen-Hyperimmunseren unbekannter
Stämme mit den Antigenen THEA und HAASE



6. Kreuz-Komplementbindungsreaktionen der Antigene LOR und OS mit den Meerschweinchen-Hyperimmunseren THEA, HAASE LOR und OS

Wie bereits im vorausgegangenen Abschnitt geschildert, fanden wir 3 Immunseren, die sich wie das Serum gegen den Stamm HAASE verhielten. Um zu prüfen, ob umgekehrt auch die entsprechenden Antigene wie das HAASE-Antigen reagieren, wurden die Antigene LOR und OS mit den Immunseren THEA und HAASE gekreuzt.

Das Ergebnis war folgendes: Die Antigene LOR und OS banden sowohl die Antikörper gegen HAASE als auch gegen THEA gleichmäßig. Die homologen Seren reagierten bis zu einem Titer von 1:64. Die Antigene LOR und OS verhalten sich also wie ein THEA-Antigen, die Antiseren LOR und OS jedoch wie ein Serum gegen den Stamm HAASE.

7. Untersuchung von Patientenseren mit dem Antigen THEA und HAASE

In dieser Versuchsreihe sollte geprüft werden, ob auch unter menschlichen Immunseren Stammdifferenzen zu finden sind.

Es wurden deshalb 48 Patientenseren mit den Antigenen DF 165 (Stamm HAASE) und DF 166 (Stamm THEA) untersucht. Von diesen Serumproben verhielten sich 11 negativ, 5 Seren konnten wegen Eigenhemmung nicht bewertet werden. Von den restlichen 32 Seren reagierten 26 gleich stark mit beiden Antigenen, 4 aber ausschließlich mit dem Stamm THEA, 2 Seren nur mit dem Antigen HAASE (Tabelle 4).

Tabelle 4 Untersuchung von 48 Patientenseren mit den Antigenen THEA und HAASE

Zahl der Seren	Davon: negativ	Eigenhemmung	positiv (> 1:8)	von den 32 positiven Seren: nur mit Antigen THEA	HAASE
48	11	5	32	4	2

Drei der Seren, die nur mit einem Antigen reagierten, stammten von Kindern im Alter von 1⁴/12, 2 und 5 Jahren.

In der Komplementbindungsreaktion wurde ferner ein Serum von einem Patienten (Nr. 1) mit Herpes-Erstinfektion gegen die Antigene THEA und HAASE geprüft (Tabelle 5).

Tabelle 5 Komplementbindungsreaktion mit dem Serum (Nr. 1) gegen die Antigene HAASE und THEA

Antigenverd.:	<u>Antigen HAASE (DF 165)</u>			<u>Antigen THEA (DF 166)</u>		
	1:4	1:8	1:16	1:4	1:8	1:16
<u>Serumverd.</u>						
1: 8	-	-	-	4+	4+	+
1: 16	-	-	-	4+	3+	-
1: 32	-	-	-	4+	4+	-
1: 64	-	-	-	4+	2+	-
1: 128	-	-	-	3+	-	-

Das Serum reagierte nur mit dem THEA-Antigen bis zu einem Titer von 1:128, mit dem HAASE-Antigen ergab es überhaupt keine Reaktion. Ein Herpes-simplex-Meerschweinchen-Hyperimmunserum der "Microbiological Associates" (Bethesda/Md, USA) und ein weiteres Herpes-simplex-Hyperimmunserum waren ebenfalls streng spezifisch für das THEA-Antigen.

Außerdem wurden noch 3 Seren eines Patienten (Nr. 2), die in Abständen von 10 Tagen nach einer fraglichen Erstinfektion (Alter: 24 Jahre) abgenommen worden waren, gegen Antigen THEA getestet. Das erste Serum war negativ, die beiden nächsten hatten Titer von 1:64. Mit dem HAASE-Antigen lag der Serumtiter mit Serum I und II unter 1:4. Die Seren IV und V (5 bzw. 9 Monate nach der Infektion, ohne Rezidiv) zeigten mit dem THEA-Antigen einen Titerabfall um 2-3 Titerstufen. Mit dem HAASE-Antigen lag der Serumtiter wiederum unter 1:4.

Tabelle 6 Patientenseren (Nr. 2) gegen Antigen THEA (DF 166, Verd. 1:4)

Serum/Tag	Titer
I (28. 1.)	< 1: 4
II (6. 2.)	1:64
III (14. 2.)	1:64
IV (20. 6.)	1:16
V (8.10.)	1: 8

Ein weiteres Serumpaar (Nr. 3) stammte von einem Patienten mit Ekzema herpeticatum. Es handelte sich um den zweiten Schub innerhalb von 6 Wochen. Davor habe der Patient "längere Zeit keinen solchen Ausschlag" gehabt. Die Seren wurden ebenfalls mit den Antigenen THEA und HAASE getestet. Das Ergebnis in Tabelle 7 zeigt, daß beide Seren mit dem Antigen HAASE deutlich schwächer als mit dem Antigen THEA reagierten. Die Zweitseren zeigten einen nicht signifikanten Titeranstieg um eine Stufe.

Tabelle 7 Patientenseren (Nr. 3) gegen die Antigene THEA und HAASE

Serum	Titer	Antigen
=====		
Serum I	1: 4	HAASE (DF 165, Verd. 1:2)
Serum II	1: 8	"
Serum I	1:16	THEA (DF 166, Verd. 1:4)
Serum II	1:32	"

8. Untersuchung von Seren von Herpes-Rezidiven

Nach Herpes-Erstinfektionen treten häufig Rezidive auf. Es interessierte deshalb die Frage, ob dadurch eine Auffrischung des Antikörperspiegels im Blut bewirkt wird.

Wir untersuchten Seren von 5 erwachsenen Patienten mit Herpes labialis, von denen wir 2 - 4 Serumproben erhalten hatten, in der Komplementbindungsreaktion mit dem Antigen THEA (DF 166, Verd. 1:4) jeweils im gleichen Testansatz. Die Erstseren waren zum Zeitpunkt des Ausbruchs des Rezidivs gewonnen worden. Die Ergebnisse in Tabelle 8 zeigen, daß kein serologischer Auffrischungseffekt nachweisbar war.

Tabelle 8 Verhalten von Herpes-Rezidiv-Seren gegen
Antigen THEA

Serumverd.	1:4	1:8	1:16	1:32
Pat./Tag				
BA 6.7.	4+	4+	2+	-
" 13.7.	4+	4+	1-2+	-
" 20.7.	4+	4+	2+	-
FA 23.7.	4+	4+	2+	-
" 26.7.	4+	4+	2-3+	-
" 31.8.	4+	4+	2+	-
KO 23.6.	4+	4+	3+	-
" 2.7.	4+	4+	3-4+	-
" 10.7.	4+	4+	4+	-
" 16.7.	4+	4+	4+	-
VI 24.5.	4+	3+	-	-
" 7.6.	4+	3-4+	-	-
FA 29.4.	4+	3-4+	-	-
" 13.5.	4+	4+	-	-

IV. Besprechung

Die Aufgabe dieser Arbeit bestand im wesentlichen darin, festzustellen, ob sich serologische Differenzen bei Herpes-simplex-Stämmen auch mit der Komplementbindungsreaktion nachweisen lassen.

Anfängliche methodische Schwierigkeiten beruhten auf dem hohen Eigenkomplementverbrauch einiger Antigenpräparationen. Beim Zentrifugieren im Dichtegradienten stellte sich heraus, daß die antikomplementären Substanzen eine größere Dichte als das infektiöse und komplementbindungsaktive Material besitzen. Es könnte sich demnach um Protein-Nukleinsäure-Komplexe handeln. Die Verteilung der Infektiosität und der Komplementbindungs-Aktivität in den Einzelnen Fraktionen stimmte mit den Ergebnissen von FALKE (1963) überein.

Nir untersuchten die von SCHNEWEIS (1962) im Neutralisationstest gefundenen Prototypen I (THEA) und II (HAASE) und kamen zu dem Ergebnis, daß antigene Unterschiede tatsächlich auch mit der Komplementbindungsreaktion erfaßt werden können. Sie sind allerdings nicht reziprok. So reagiert das HAASE-Antigen nur mit dem homologen Immunserum, jedoch kaum mit dem THEA-Antiserum. Die THEA-Antigene hingegen binden Antikörper beider Seren gleichmäßig. Von den Antisera gegen 8 frisch isolierte Herpes-simplex-Stämme ließen sich 2 in die

THEA-Gruppe (Stämme BLU, KLA) und 3 in die HAASE-Gruppe (Stämme LOR, GER, OS) einordnen. Wahrscheinlich existiert noch eine dritte Gruppe, die sich intermediär verhält (Stamm KO). Möglicherweise muß noch mit einer vierten Gruppe gerechnet werden, da 2 menschliche Seren festgestellt wurden, die stärker mit dem HAASE- als dem THEA-Antigen reagierten.

In neueren Arbeiten sind wiederholt antigene Unterschiede bei Herpes-simplex-Stämmen beobachtet worden. ASHE und SCHERP (1963) berichteten über 4 antigene Gruppen im Neutralisationstest, nach FLUMMER (1964) bestehen 2 Subtypen, SHUBLADZE und Mitarb. (1960) unterschieden 3 serologische Gruppen.

Unsere Ergebnisse mit der Komplementbindungsreaktion bestätigen die von SCHNEWEIS im Neutralisationstest gefundenen Stammdifferenzen. SCHNEWEIS jedoch gibt an, daß die Unterschiede in der Komplementbindungsreaktion weniger deutlich als im Neutralisationstest ausgeprägt seien. Die von uns wiederholt durchgeführten Untersuchungsreihen mit verschiedenen Antigenen des gleichen Stammes zeigten, daß diese Unterschiede deutlich feststellbar, jedoch nicht reziprok sind. Wir möchten daher nicht wie SCHNEWEIS von "Typen-", sondern nur von Stammdifferenzen sprechen, weil die relativ geringen Titerunterschiede die Einteilung in Typen nicht rechtfertigen.

Wir vermuten, daß die beschriebenen Differenzen sog. "one-way crossings" sind, die KARZON (1957) bei verschiedenen ECHO-6-Stämmen diskutiert hat. ORMSBEE und MELNICK (1957) sowie KAMITSUKA und Mitarb. (1961) beschrieben gleichfalls "one-way crossings" bei ECHO-Viren. Ähnliche Beobachtungen machten CHOPPIN und EGGERS (1962) bei Coxsackie B4-Virusstämmen sowie ROWE und Mitarb. (1958) bei Adenoviren.

Die Beobachtungen über "one-way crossing" werden von den Autoren verschieden interpretiert. CHOPPIN und EGGERS (1962) deuteten das Verhalten antigenetisch ähnlicher Virusteilchen mit einer unterschiedlichen "Antikörpersensibilität". Der Grund für dieses Verhalten kann einmal in den Bindungskraften (Avidität) zwischen Virus und Antikörper gesucht werden, zum anderen in der Menge der Antikörper, die unter bestimmten Versuchsbedingungen gebunden werden.

ORMSBEE und MELNICK (1957) vermuteten einen Unterschied in der Beschaffenheit des Virus, sodaß daraus eine partielle antigenetische Unzulänglichkeit resultiert. Auch nahmen sie an, daß es sich bei der ECHO-6-Virusgruppe um Mischungen von Virusstämmen oder um Variationen innerhalb eines Typs handeln könne.

SCHNEWEIS (1962) vermutete, daß die Stämme vom "Typ" II in der antigenen Grundstruktur denen vom "Typ" I gleichen, daß sie aber ein zusätzliches Antigen besitzen, das beim "Typ" I nicht vorkommt.

In unseren Versuchen lag eine Mischung von V- und S-Antigenen vor. Aber auch bei der "Trennung in V- und S-Antigene" gelang es SCHNEWEIS (1962) nicht, genauere Aussagen über die Spezifität der Herpes-simplex-Stämme zu machen. Andererseits ist es bis heute nicht gelungen, reines S-Antigen herzustellen und dessen serologische Spezifität zu bestimmen.

Wir neigen der Ansicht zu, daß die beobachteten Stammdifferenzen auf Unterschieden in der "Antikörpersensibilität" der Virusteilchen beruhen, wobei das THEA-Antigen das umfassendere wäre, d.h. die größere Empfindlichkeitsbreite besitzt. Auch ist an noch nicht näher bekannte Hemmstoffe für die Antigene im Serum zu denken, die sich in der Komplementbindungsreaktion bemerkbar machen könnten. So ließe sich wohl am ehesten das Verhalten der Stämme LOR und OS erklären, deren Antigene wie der Stamm THEA, deren Immunseren aber wie Seren vom Stamm HAASE reagierten.

Auch bei menschlichen Seren wurden stammspezifische Reaktionen beobachtet.

Das erste Serum (Nr. 1) stammte von einem Patienten mit Stomatitis aphthosa, bei der es sich vermutlich um eine Erstinfektion gehandelt hat. Das Serum Nr. 2 war bei einem Patienten entnommen worden, der eine Laborinfektion mit Herpes-simplex-Virus am Augenlid aufwies. Daß es sich hier um eine Erstinfektion gehandelt haben muß, kann durch den signifikanten Titeranstieg von $<1:2$ auf $1:64$ und durch die Anamnese als bewiesen gelten.

Im Hinblick auf die Rezidivneigung der Herpes-simplex-Infektion interessierte das Verhalten des Antikörperspiegels nach Rezidiven. Die Untersuchung von 5 Serumpaaren von Patienten

mit Herpesrezidiven an den Lippen ließ keinen Anstieg erkennen. Ähnliche Feststellungen machten bereits ANDREWS und CARMICHAEL (1930) bei wiederholten Herpesausbrüchen. Nur bei einigen Jugendlichen ließ sich ein geringer Anstieg sowohl im Neutralisationstest als auch in der Komplementbindungsreaktion nachweisen.

Die Beispiele zeigen, daß im menschlichen Organismus stammspezifische Herpes-Antikörper gebildet werden. Ob diese Spezifität jedoch im Laufe des Lebens durch wiederholte Rezidive verlorengeht, ist nicht bekannt. Für diagnostische und epidemiologische Untersuchungen menschlicher Seren ist es unerlässlich mit verschiedenen Herpes-Antigenen zu testen, um alle antikörperhaltigen Seren zu erfassen.

V. Zusammenfassung

- 1) In Kreuz-Komplementbindungsreaktionen wurden zunächst die Antigene der Stämme THEA und HAASE verglichen. Während das Antigen THEA mit beiden Immunseren (THEA und HAASE) gleich stark reagierte, war die Bindung des HAASE-Antigens mit den Antikörpern des THEA-Immunserum nur schwach ausgeprägt. Die Unterschiede sind also nicht reziprok, sondern es liegt ein "one-way crossing" vor.
- 2) Die serologischen Unterschiede der Herpes-simplex-Stämme werden nicht als "Typen-", sondern nur als "Stammdifferenzen" der Antigene gedeutet.
- 3) Mit Hilfe von Meerschweinchen-Hyperimmunseren von frisch isolierten Herpes-simplex-Stämmen ließen sich 2 in die THEA- und 3 in die HAASE-Gruppe einreihen. Wahrscheinlich gibt es noch eine dritte Gruppe, die sich intermediär verhält (Stamm KO), und eine vierte Gruppe, die mit HAASE-Antigen stärker reagiert als mit THEA-Antigen.
- 4) Auch bei 48 Patientenseren wurden stammspezifische Reaktionen und Unterschiede festgestellt. Es ist daher bei epidemiologischen Studien sowie bei der Serodiagnostik erforderlich mit verschiedenen Antigenen zu arbeiten, um alle Antikörper zu erfassen.
- 5) Beim Auftreten von Herpes-Rezidiven ist kein Anstieg der Antikörper im Sinne eines antigenen Auffrischungseffektes beobachtet worden.

VI. Literaturverzeichnis

- ANDREWS, C.H. and E.A. CARMICHAEL: A note on the presence of antibodies to herpes virus in post-encephalitic and other human sera. *Lancet* 218 (1930) 857-858
- ASHE, W.K. and H.W. SCHERP: Antigenetic analysis of herpes simplex virus by neutralization kinetics. *J. Immunol.* 91 (1963) 658-665
- BLANK, H. and G. RAKE: Herpes simplex. From: *Viral and rickettsial diseases of the skin, eye and mucous membranes of man.* London, J. and A. Churchill LTD. (1955)
- BURNET, F.M.: Principles of animal virology. Academic Press, New York & London (1960)
- BURNET, F.M. and D. LUSH: Herpes simplex. Studies on the antibody content of human sera. *Lancet* 236 (1939) 629-631
- CHOPPIN, P.W. and H.J. EGGERS: Heterogeneity of coxsackie B4 virus: Two kinds of particles which differ in antibody sensitivity, growth rate, and plaque size. *Virology* 18 (1962) 470-476
- CHU, L-W. and G.H. WARREN: Pathogenicity and immunogenicity herpes simplex virus strains propagated in rabbit kidney tissue. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* 105 (1960) 396-399
- FALKE, D.: Biologische Aktivität und Teilchenform des Herpes-simplex-Virus nach Dichte-Gradienten-Zentrifugierung. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* 191 (1963) 247-252
- FLOMAN, A.L. and F.W. TRADER: A comparative study of pathogenicity and antigenicity of four strains of herpes simplex. *J. Immunol.* 55 (1947) 263-275
- GARABEDIAN, G.A. and J.T. SYVERTON: Studies on herpes simplex virus. I. An antigenetic analysis of four strains of virus isolated from a human subject. *J. infect. Dis.* 96 (1955) 1-4

- GRAY, A., T. TOKUMARU and T.F. McNair SCOTT: Different cytopathogenic effects observed in HeLa cells infected with HSV. Arch. ges. Virusforsch. 8 (1958) 59-76
- GROSS, W.O., A. ORTMANN und CHR. REISSMANN: Virusstämme zweier getrennter Herpesausbrüche eines Patienten im serologischen Vergleich. Z. Immun.-Forsch. 113 (1956) 453-471
- GRÜTER, W.: Das Herpesvirus, seine ätiologische und klinische Bedeutung. Münch. . med. Wschr. 71 (1924) 1058-1060
- GRÜTER, W.: Experimentelle und klinische Untersuchungen über den sogenannten Herpes corneae. Klin. Mbl. Augenheilk. 65 (1920) 398-399
- HAYMAKER, W.: Herpes encephalitis in man. J. Neuropath., Baltimore, (1949) 132-154
- HAYWARD, M.E.: Serological studies with herpes simplex virus. Brit. J. exp. Path. 30 (1949) 520-529
- HAYWARD, M.E.: Serological diagnosis of herpes simplex infections. Lancet 258 (1950) 856-858
- JAWETZ, E., V.R. COLEMAN and E.R. MERRILL: Studies on herpes simplex. VII. Immunological comparison of strains of herpes simplex. J. Immunol. 75 (1955) 28-34
- KAMITSUKA, P.S., M.E. SOERGEL and H.A. WENNER: Production and standardization of ECHO reference antisera. Amer. J. Hyg. 74 (1961) 7-25
- KARZON, D.T.: Cellular biology, nucleid acids and viruses. Diskussionsbemerkung. Special Publications N.Y. Acad. Sci. V (1957) 388-390
- KILBOURNE, E.D. and F.L. HORSFALL jr.: Studies of herpes simplex virus in newborn mice. J. Immunol. 67 (1951) 321-329
- KRÜCKE, W.: Über eine besondere Form der spontanen Encephalitis. Nervenarzt 28 (1957) 289-301
- LÖWENSTEIN, A.: Ätiologische Untersuchungen über den fieberhaften Herpes. Münch. med. Wschr. 66 (1919) 769-770

- MESELSON, M., F.W. STAHL and J. VINOGRAD: Equilibrium sedimentation of macromolecules in density gradients.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 43 (1957) 581-588
- OKUMOTO, M., E. JAWETZ and M. SONNE: Studies on herpes simplex virus. IX. Corneal responses to repeated inoculation with herpes simplex virus in rabbits.
Amer. J. Ophthal. 47 (1959) 61-66
- ORMSBEE, R.A. and J.L. MELNICK: Biologic and serologic characteristics of ECHO-viruses from west virginia.
J. Immunol. 79 (1957) 384-392
- PLUMMER, G.: Serological comparison of the herpes viruses.
Brit. J. exp. Path. 45 (1964) 135-141
- ROIZMAN, B. and P.R. Roane: Demonstration of a surface difference between virions of two strains of herpes simplex virus. Virology 19 (1963) 198-204
- ROWE, R.W., HARTLEY and R.J. HUEBNER: Serotype composition of the adenovirusgroup.
Proc. Soc. exp. Biol. 97 (1958) 465-470
- SCHIEFERSTEIN, G.: Das cytopathische Verhalten frisch isolierter Stämme des Herpes-simplex-Virus in Zellkulturen.
Inauguraldissertation, Marburg 1963
- SCHNEWEIS, K-E.: Serologische Untersuchungen zur Typendifferenzierung des Herpesvirus hominis.
Z. Immun.-Forsch. 124 (1962) 24-48
- SCHNEWEIS, K-E.: Der cytopathische Effekt des Herpes simplex virus. Stammdifferenzen, Stabilität, Einfluß von Immunseren und Beziehung zur Pockengröße.
Zbl. Bakt. I. Orig. 186 (1962) 467-491
- SCOTT, T.F. McNair and D.L. McLeod: Cellular responses to infection with strains of herpes simplex virus.
Ann.N.Y. Acad. Sci. 81 (1959) 118-128
- SEVER, J.L.: Application of a microtechnique to viral serological investigations.
J. Immunol. 88 (1962) 320-329
- SHUBLADZE, A.K., T.M. MAEVSKAYA, V.A. ANANEV and V.M. VOLKOVA (1960) zit. nach PLUMMER, G. (1964)

- SLAVIN, H.B. and E.GAVETT: Antigenic dissimilarity between strains of herpes simplex virus.
Proc. Soc. exp. Biol. 63 (1946) 345-347
- TUCKER, E.S. and G.F. SCOFIELD: Hepatoadrenal necroses.
(Fatal systemic herpes simplex infections. Review of literature and two cases)
Arch. Path. 71 (1961) 538-547
- WOMACK, C.R. and C.C. RANDALL: Erythema exsudativum multiforme
(Its association with viral infections)
Amer. J. Med. 15 (1953) 633-643
- WOMACK, C.R. and P.B. HUNT: Serologic differences in strains of herpes simplex virus.
Science 120 (1954) 227-228
- WRIGHT, H.T., C.R. GOODHAERT and A. LIEHLHAUSIS: Human cytomegalovirus. Morphology by negative staining.
Virology 23 (1964) 419-424

Herrn Prof. Dr. med. R. Siegert danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und Arbeitsplatzes in seinem Institut sowie die wohlwollende Beratung bei der Abfassung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Doz. Dr. med. D. Falke für seine immer bereite Hilfe bei der Durchführung der Versuche und die fördernden Hinweise bei deren Auswertung.

Ferner sage ich Herrn Dr. H. Kohlhage meinen herzlichen Dank für die Anleitung zu virologischem Arbeiten.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren
und Dozenten:

- in Marburg: Berendes, Bickel, Bock, Braun-Falco, Dimroth,
Dorer, Exner, Förster, Gedigk, Hamm, Hartmann,
Jacob, Linneweh, Mahr, v. Manger-König, Martini
Maurath, W. Meyer, Niessing, Oehme, Oehmig,
Petry, Pirson, Roger, Sauer, W. Schmid,
Schölmerich, Schwaiger, Seidel, Siegert, Siess,
Straub, Stutte, Vogt, Walcher, Wendt, Würterle.
- in Berlin: Clemens, Dulce, M.-H. Fischer, Gansau, Handl,
Heim, v. Herrath, Höring, Kleberger, Link,
Maßhoff, Pezold, B. Schmidt, Schmitt-Rohde,
Schütte, Schütz, Schwarz, Stoboy.
- in Freiburg: Bätzner, Begemann, Büchner, Creutzfeld, Dietz,
Faust, Göpfert, Grundmann, Haas, Hahn, Hauf,
Heilmeyer, Hummel, Kalkoff, Keiderling, Keller,
Krauss, Mey, Rehm, Sarre, Stutz, Vivell,
Wetzel, Wimböfer.

Lebenslauf

Am 6. Januar 1939 wurde ich als drittes Kind des Städt. Oberverwaltungsdirektors Dr. Wilhelm Niemeyer und seiner Ehefrau Helene, geb. Büchy in Gadderbaum Kr. Bielefeld geboren.

Schulbesuch von Herbst 1945 bis Ostern 1958. Reifeprüfung am 8. März 1958 am Bavink-Gymnasium Bielefeld.

Studienbeginn im SS 1958 an der Medizinischen Fakultät der Philipps-Universität in Marburg. Naturwissenschaftliche Vorprüfung daselbst am 11. März 1959.

Fortsetzung des Studiums an der Freien Universität Berlin im SS 1959 bis WS 1960/61. Ärztliche Vorprüfung am

1. September 1960 daselbst. Vom SS 1961 bis WS 1961/62

Studium an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg.

Beendigung des Studiums an der Philipps-Universität Marburg

und Ablegung des Medizinischen Staatsexamens am 22. September

1964. Beginn der Medizinalassistentenzeit am 1. November 1964 am Hygiene-Institut der Universität Marburg.

